

多抗菌剂对植烟土壤细菌群落多样性的影响

张忠民¹,刘虎^{2*},丁延芹²,南龙²,汪城墙²,王君²,郭海萌²,杜秉海^{2**}

1. 济宁学院, 山东 曲阜 273155

2. 山东农业大学生命科学学院/山东省农业微生物重点实验室, 山东 泰安 271018

摘要: 本试验运用 454 焦磷酸高通量测序的方法对施用多抗菌剂的植烟土壤进行细菌群落结构分析。结果发现: 植烟土壤中细菌的种类主要集中在变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)和厚壁菌门(Firmicutes)。施用多抗菌剂与未施用多抗菌剂的样品相比, 根际土壤中细菌总纲数减少 7.27%, 检测到的 OTU 数目减少 12.83%; 非根际土中, 细菌的总纲数减少 4.62%, 检测到的 OTU 数目减少 20.31%。可见, 施用多抗菌剂可以降低植烟土壤中细菌群落多样性。

关键词: 植烟土壤; 细菌群落多样性; 454 焦磷酸测序; 多抗菌剂

中图分类号: S154.37

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2015)04-0528-05

The Effect of Multiple Antimicrobial Inoculant on the Bacterial Community Diversity in Tobacco Planting Soil

ZHANG Zhong-min¹, LIU Hu^{2*}, DENG Yan-qin², NAN Long², WANG Cheng-qiang², WANG Jun², GUO Hai-meng², DU Bing-hai^{2**}

1. Jining University, Qufu 273155, China

2. College of Life Sciences/Shandong Agricultural University/Shandong Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Taian 271018, China

Abstract: We used 454 pyrophosphate sequencing approach to analyze the bacterial community structure of the tobacco planting soils with multiple antimicrobial inoculant. The results showed that the bacterium in tobacco planting soil which was detected in this experiment belong to five phyla. They are Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Gemmatimonadetes, Firmicutes compared with rhizosphere soil without using multiple antimicrobial inoculants, the number of class which belonged to rhizosphere soil with multiple antimicrobial inoculant reduced 7.27%, and the number of OTU reduced 12.83%. Compared with non-rhizosphere soil without using multiple antimicrobial inoculants, the number of class which belonged to non-rhizosphere soil with multiple antimicrobial inoculant reduced 4.62%, and the number of OTU reduced 20.31%. Obviously, multiple antimicrobial inoculants can lead the decrease in microbial diversity of tobacco planting soil.

Keywords: Tobacco planting soil; bacterial community diversity; 454 pyrophosphate sequencing; multiple antimicrobial inoculant

烟草青枯病是由 *Ralstonia solanacearum* 引起的一种细菌性病害, 是烟草的重要病害之一。几乎存在于世界各植烟地区, 特别是在热带和亚热带以及一些温带地区较为集中^[1]。青枯病一旦发病, 会对烟草的产量和烟叶的质量造成极大的影响^[2]。烟草黑胫病也是烟草生产中较为严重的土传病害, 发病严重时会造成绝产。目前对青枯病和黑胫病的防治主要是合理轮作、选育抗性品种、药剂防治^[3-5]、, 以及施用可以有效降低青枯病发病率的生物有机肥的生物防治^[6]。

土壤是微生物活动的大本营, 土壤中蕴含大量的微生物。土壤微生物群落是土壤生物区系中最重要的功能成分, 对于环境变化程度十分敏感, 根据环境变化, 土壤微生物能够在结构和功能上做出响应^[7], 土壤微生物群落多样性是土壤微生物活性指标中最重要的因素, 与土壤生态稳定密切相关。在植物病害的生防过程中使用的一些菌剂可能会对植物根际土壤中的微生物群落产生影响。有研究表明施用棉花黄萎病拮抗菌后棉花根际土壤中微生物的数量发生变化, 真菌数量减少^[8]。

传统的土壤微生物群落结构分析通常采用在普通凝胶电泳基础上发展来的 DGGE(变性梯度凝胶电泳法)^[9], 以及建立在 PCR 技术基础上, 结合 DNA 限制性酶切技术、荧光标记技术和 DNA 序

收稿日期: 2014-06-23

修回日期: 2014-07-02

基金项目: 湖南中烟工业有限责任公司科技项目(2011-yc-0002)

作者简介: 张忠民(1978-),男,硕士,讲师,主要从事生物学教学与研究. E-mail:317291125@qq.com

*并列第一作者: 刘虎(1990-),男,山东临沂人,在读硕士研究生,主要从事环境微生物研究. E-mail:liuhu20090905@163.com

**通讯作者: Author for correspondence. E-mail:du_binghai@163.com

列自动分析技术的 T-RFLP (即末端标记限制性片段长度多态性)^[10,11]、还有 FAME (脂肪酸甲酯分析) 和 PLFA (磷脂脂肪酸分析) 等方法。但是这些技术工作量较大, 且获得的信息量少。新兴的罗氏 454 和 Illumina 高通量测序可以有效地减少工作量, 提高工作效率。罗氏 454 高通量测序是依据焦磷酸测序基本原理, 454 测序无需建库, 每次反应可以获取 100 万个测序读长在 400~500 bp 的序列片段, 测序准确性高^[12,13], 同时高通量测序还有助于发现新物种。

本实验以烟草青枯病拮抗菌多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) YD0136、短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) DZQ3 以及烟草黑胫病拮抗菌多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) YD0573 组成的多抗菌剂进行大田试验, 采用 454 高通量测序方法研究多抗菌剂对烟草根际土壤和非根际土壤细菌群落多样性的影响。

1 材料与方法

1.1 取样

取样地点在贵州省遵义市道真县 (经度 107.6°, 纬度 28.89°) 隆兴镇浣溪村化木岭组, 海拔高度 1264 m。取样时间为 2013 年 7 月 28 日。取样处理为添加多抗菌剂的非根际土、未添加多抗菌剂的非根际土、未添加多抗菌剂的根际土、添加多抗菌剂的根际土, 分别编号为 S1、S2、S3、S4。土样取出后保存在 -20 °C 冰箱中备用。

1.2 样品处理

土壤总 DNA 的提取: 土壤总 DNA 的提取采用美国 OMEGA 公司生产的 E.Z.N.A. Soil DNA Kit 试剂盒。将提取的土壤总 DNA 检测合格后, 密封, 用冰袋寄送到上海人类基因组研究中心基因组测序部, 测序仪器为 454 GX-FLX (Roche, 罗氏公司)。

2 结果分析

由图 1 稀释曲线可以看出随着测序数据的增加, 曲线的斜率逐渐变小, 说明更多的取样只会产生少量新的物种。本试验数据分析选择测序数量为 10000 条, 此时曲线斜率变小, 基本能够反映物种的丰富度, 说明取样数量合理。

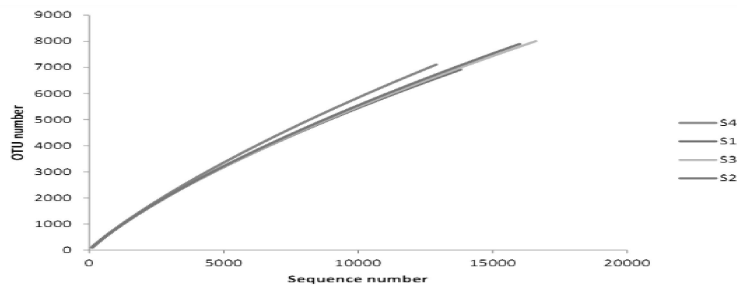


图 1 稀释曲线
Fig.1 Dilution curve

2.1 丰度及多样性评估

ACE 指数和 Chao 指数用于估算样本中含有的 OTU 数目, 即所含物种的总数。由表 1 可以看出: S2 处理的 ACE 指数、Chao 指数均大于 S1 处理的 ACE 指数、Chao 指数; S4 处理的 ACE 指数大于 S3 处理的 ACE 指数, S4 处理的 Chao 指数小于 S3 处理的 Chao 指数。S2、S3、S4、S1 的 Shannon 指数依次减小。OTU 数由 S3、S2、S4、S1 依次减小。

表 1 样本的多样性指数 (97%相似水平)

Table 1 The community index (97% similarity level)

| 处理 Treatments | 菌群多样性指数(Shanon) Community diversity index | 群落丰富度指数(Chao) Community abundance index | 群落丰富度指数(ACE) Community abundance index |
|------------------|--|--|---|
| S1 | 8.214612 | 20399.06 | 39544.61 |
| S2 | 8.280843 | 24178.55 | 47926.8 |
| S3 | 8.27974 | 23932.74 | 44203.52 |
| S4 | 8.266288 | 23265.82 | 46404.18 |

Shannon 指数是用来估算样品中微生物的多样性指数之一,它常用来反映 α -多样性。Shannon 值越大,说明群落多样性越高。S2、S3、S4、S1 的 Shannon 指数依次减小说明添加多抗菌剂的非根际土群落多样性最低,添加多抗菌剂的根际土 S4 的群落多样性要低于未添加多抗菌剂的根际土 S3。

2.2 分类统计

对测序得到的 OTU 结果进行分析可知, S1、S2、S3、S4 四个样品中检测到细菌门数分别为 30、29、23、26; 细菌纲数分别为 62、65、55、51; 细菌目数分别为 98、98、87、78; 细菌科数分别为 155、152、139、131; 细菌属数分别为 225、235、234、210。在纲、目、科、属水平均表现出施多抗菌剂的样品要小于未施用样品, 其中在纲水平上 S1 比 S2 减少 4.62%, S4 比 S3 减少 7.27%。

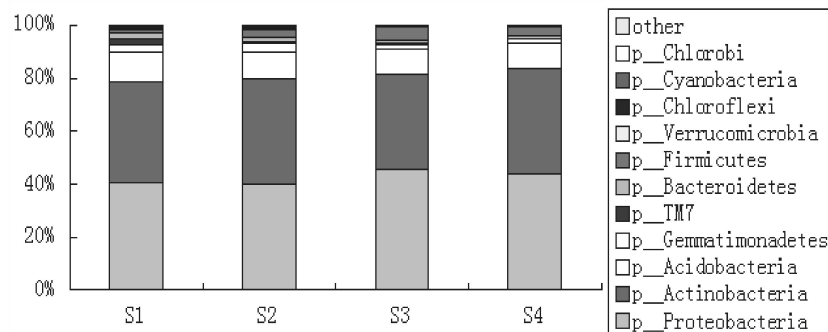


图 2 样本的群落结构相对丰度 (门水平)

Fig.2 The relative abundance of bacterial in phylum level

由图 2 可以看出: 在四个植烟土壤样品中变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、厚壁菌门 (Firmicutes) 所占比例较高, 在 S1、S2、S3、S4 中分别占 93.9%、96.4%、97.4%、98.0%。其中芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 在根际土和非根际土中的分布存在差异。芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 在非根际土 S1 中约占 2.9%, S2 中占 3.5%, 而在根际土 S3 中只占 1.85%, S4 中占 1.49%; 厚壁菌门 (Firmicutes) 在根际土 S3 中约占 4.6%, S4 中占 3.3%, 而在非根际土 S1 中占 1.3%, S2 中占 3.0%。

四个样品中存在各自特有的门, 样品 S1 中特有的菌门: 螺旋体门 (Spirochaetes); 样品 S2 中特有的菌门: 软壁菌门 (Tenericutes); 样品 S4 中特有的菌门: LCP-89。在非根际土样品(S1&S2)中特有的菌门: 脱铁杆菌门 (Deferribacteres)、GN04、Synergistetes; 根际土样品(S3&S4)中特有的菌门: 纤维杆菌门 (Fibrobacteres)。

对四个样品中含量最高的变形菌门 (Proteobacteria) 进行纲水平分析, 其中 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 含量最高, S1、S2、S3、S4 所占比例分别为 66.9%、69.1%、50.3%、63.9%。 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 在根际土中的含量较高, 添加多抗菌剂的处理为 27.05%, 未添加多抗菌剂的处理为 31.63%; 而在非根际土中添加多抗菌剂的处理为 11.01%, 未添加多抗菌剂的处理为 10.68%。在未添加多抗菌剂的处理 S2 和 S3 中存在特有的纲: 非根际土 S2 中为 TA18 以及一个尚未确定的纲; 根际土 S3 中为 ϵ -变形菌纲 (Epsilonproteobacteria)。

2.3 β 多样性评估

由图 3 可以看出: 样品 S1 中的 OTU 数为 4249, 样品 S2 中的 OTU 数为 5332, 样品 S3 中的 OTU 数为 4997, 样品 S4 中的 OTU 数为 4356。非根际土中, 添加多抗菌剂的处理 S1 的 OTU 数目比未添加多抗菌剂的处理 S2 的 OTU 数目减少 20.31%; 根际土中, 添加多抗菌剂的处理 S4 的 OTU 数目比未添加多抗菌剂的处理 S3 的 OTU 数目减少 12.83%。

样品 S1 中特有的 OTU 数为 1592, 样品 S2 中特有的 OTU 数为 2763, 样品 S3 中特有的 OTU 数为 1939, 样品 S4 中特有的 OTU 数为 1578。样品 S1 和 S2 共有的 OTU 数为 1694; 样品 S3 和 S4 共有 OTU 数为 2012; 样品 S1 和 S4 共有 OTU 数为 1454; 样品 S2 和 S3 共有 OTU 数为 1523。

相似水平为 97%时的 OTU 数可以代表菌种数目。样品 S2、S3、S4、S1 所含有的总 OTU 数目依次减小说明施用多抗菌剂后菌种数目减少。施用多抗菌剂后特有 OTU 也呈现减少趋势。添加多抗菌剂的非根际土 S1 的 OTU 数目的减少幅度达到 20.31%。添加多抗菌剂的根际土 S4 的 OTU 数目减少幅度为 12.83%。

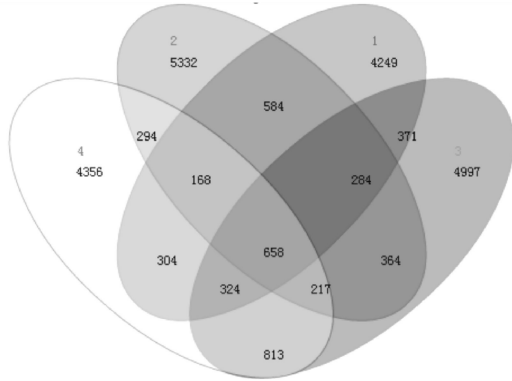


图 3 样品共有和特有的 OTU 数目 (97%相似水平)
Fig.3 The amount of common and peculiar OTU in four samples (97% similarity level)

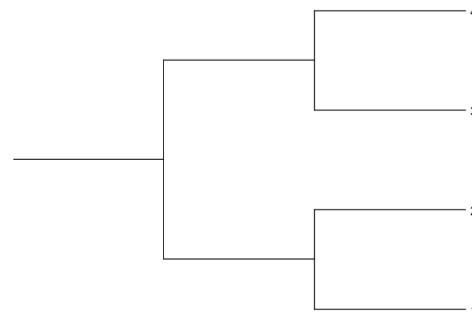


图 4 样品的群落结构相似度树状图(97%相似水平)
Fig.4 The tree of community structural similarity (97%similarity level)

注: 图中 1 表示样品 S1; 2 表示样品 S2; 3 表示样品 S3; 4 表示样品 S4
Note: 1 represents the sample S1, 2 represents the sample S2, 3 represents the sample S3, and 4 represents the sample S4

比较多个样品中 OTU 组成的差异及各 OTU 中含有的序列丰度, 计算每个样品在 97%相似水平下的群落结构相似度, 可以从整个分类系统上全面了解样品中所有微生物的进化关系和丰富度差异。由图 4 可以看出样品 S1 和 S2 属于同一分支距离比较近, 样品 S3 和 S4 属于同一分支距离比较近。说明非根际土样品 S1 和 S2 群落结构相似, 根际土样品 S3 和 S4 群落结构相似。样品 S2 和样品 S3 虽然不在同一分支, 但是距离较近, 群落结构也较为相似。

由图 5 HeatMap 热图分析可以看出样品 S1 和样品 S2 聚在一起, 相似度极高, 样品 S3 和样品 S4 聚在一起, 相似度较高。在 HeatMap 图中颜色的变化, 表明物种丰度不同。样品 S1 和 S2 在土壤杆菌目 (Solirubrobacterales)、Syntrophobacterales、酸杆菌目 (Acidobacteriales)、Solibacterales、Saprospirales、鞘脂单胞菌目 (Sphingomonadales)、放线菌目 (Actinomycetales) 丰度上存在差异, S1 中 Solibacterales、Solirubrobacterales、酸杆菌目 (Acidobacteriales)、放线菌目 (Actinomycetales)、鞘脂单胞菌目 (Sphingomonadales) 丰度较低。样品 S3 和 S4 中 Solibacterales、假单胞菌目 (Pseudomonadales)、Syntrophobacterales、Ellin329、Saprospirales、放线菌目 (Actinomycetales) 丰度差异明显。在样品 S4 中均表现出丰度较低。

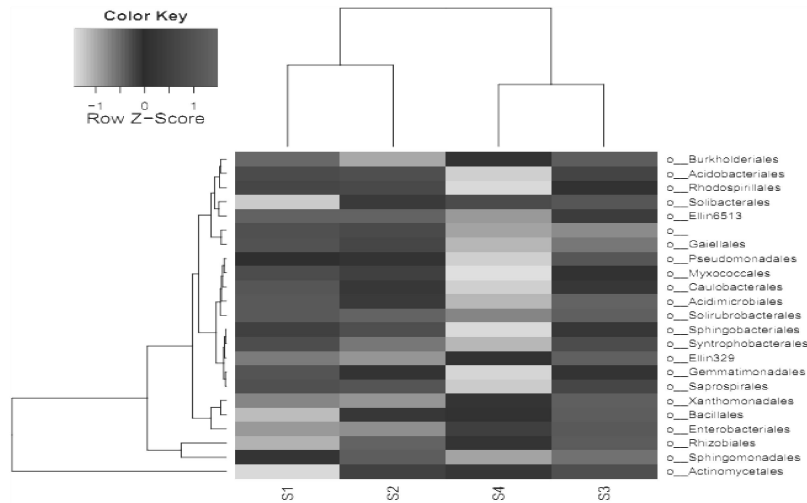


图 5 样本的聚类分析图 (目水平)
Fig.5 The clustering analysis of bacterial in order level

3 结论与讨论

土壤微生物群落多样性是土壤微生物活性指标中最重要的因素,与土壤生态稳定密切相关。土壤群落能够在结构上对环境变化做出及时响应^[7]。有研究表明在棉花连作土壤中施用棉花黄萎病拮抗菌和相应的有机肥能够使土壤中真菌数量减少,细菌和放线菌数量增加,细菌增加7.3~13.4倍^[14]。本试验中样品S3和S4的ACE指数和Chao指数的比较表现出来的趋势存在差异,可能是因为两个指数的算法不同,造成试验了结果上的差别。结果分析发现施用多抗菌剂的土壤要比未施用多抗菌剂的土壤中细菌种类少,其可能原因是施用的多抗菌剂主要用来防治烟草青枯病,而青枯病的病原菌属于细菌,生防菌产生的抗菌物质可能会对与病原菌亲缘关系较近的菌产生拮抗作用。在施用多抗菌剂的土壤中,根际土的细菌数量要比非根际土的细菌数量少,这可能是由于多抗菌剂是灌根施用,集中在烟株的根部,能够在根部局布范围内定殖,在烟株根际发挥作用,抑制了其他细菌的定殖,还有可能是多抗菌剂诱导烟草在根部产生某些物质,影响部分细菌的定殖。

综上所述,施用多抗菌剂可以改变烟草土壤中细菌群落多样性,施用多抗菌剂后植烟土壤中细菌群落多样性降低,同时烟株根际土的细菌多样性要低于烟株非根际土。

参考文献

- [1] Hayward AC. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1991, 29: 65-87
- [2] 番华彩,唐嘉义,秦小萍.烟草青枯病防治研究进展[J].云南大学学报(自然科学版),2008,30(S1):31-35
- [3] 徐辉,熊霞.烟草青枯病防治技术研究进展[J].湖南农业科学,2009(4):91-93,94
- [4] 刘雅婷,张世光.烟草青枯病的研究进展[J].云南农业大学学报,2001,16(1):72-76
- [5] 马国胜,高智谋,陈娟.烟草黑胫病研究进展[J].烟草科技,2001(9):44-48
- [6] 刘艳霞,李想,曹毅.抑制烟草青枯病型生物有机肥的田间防效研究[J].植物营养与肥料学报,2014,20(5):1203-1211
- [7] 余悦.黄河三角洲原生演替中土壤微生物多样性及其与土壤理化性质关系[D].济南:山东大学,2012
- [8] 程凯,江欢欢,沈标,等.棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物防治效果[J].植物营养与肥料学报,2011,17(1):166-174
- [9] 彭科峰,曹立群,吴韶平等. DGGE 和 T-RFLP 在堆肥微生物群落结构研究中的应用[J].生物信息学,2007,5:31-33
- [10] 罗佳捷,李丽立,张彬. T-RFLP 技术及其在微生物群落结构研究中的应用[J].中国畜牧兽医,2009,36(7):75-78
- [11] 贾俊涛,宋林生,李筠. T-RFLP 技术及其在微生物群落结构研究中的应用[J].海洋科学,2004,28(3):64-68
- [12] 华蔚颖,徐昭,张梦晖. CVTree 在 454 高通量测序分析菌群结构中的应用[J].中国微生态学杂志,2010,22(4):312-316
- [13] 李桥,王龙龙. 454 高通量测序技术在土壤微生物中的应用[J].绿色科技,2013(8):203-205
- [14] 张慧,杨兴明,冉炜.土传棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物效应[J].土壤学报,2008,45(6):1095-1101